



(12) 등록특허공보(B1)

(24) 등록일자 2022년05월25일

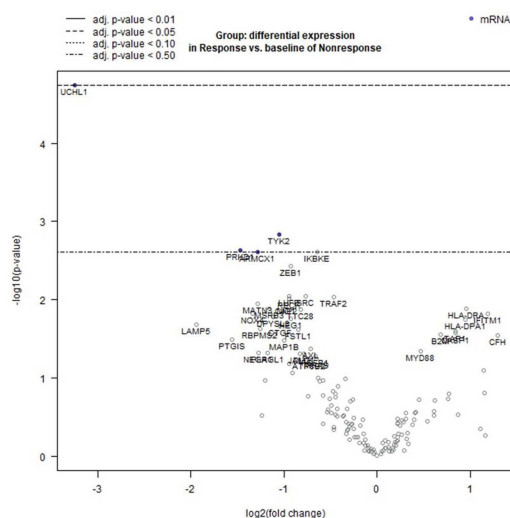
- (73) 특허권자
지니너스 주식회사
서울특별시 송파구 정의로 70 , 5층(문정동, 케이디유타워)
- (72) 발명자
김경미
서울특별시 강남구 도곡로4길 31, 102동 705호(도곡동, 도곡현대하이페리온)
- 이지연
서울특별시 송파구 올림픽로35가길 9, 101동 2202호(신천동, 잠실 푸르지오 월드마크)
- (74) 대리인
특허법인(유한)아이시스

심사관 : 손영희

(57) 요약

본 발명은 면역치료 항암제 반응성 예측용 바이오마커 및 이의 용도에 관한 것으로서, 보다 구체적으로 ARMCX1(Armadillo repeat-containing X-linked protein 1), PRKD1(Serine/threonine-protein kinase D1) 및 TYK2(Tyrosine Kinase 2)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질을 포함하는, PD-1 억제제인 펌브롤리주맙(Pembrolizumab)에 대한 반응성 예측용 마커 조성물, 반응성 예측용 조성물 및 키트, 및 반응성 예측을 위한 정보제공방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 유전자 마커는 환자유래 포르말린 고정 파라핀 포매 조직을 활용하여 분석하기 때문에 별도의 샘플 채취가 필요 없어 분석이 편리하며 유전자 발현 분석을 통해 상기 면역항암제에 대한 반응성을 미리 예측할 수 있어 최적의 치료법 선택을 위한 정보를 제공할 수 있으므로 임상에서 유용하게 이용될 것으로 기대된다.

대표도 - 도2a



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/106 (2013.01)
 C12Q 2600/118 (2013.01)
 C12Q 2600/158 (2013.01)
 G01N 2333/4703 (2013.01)
 G01N 2333/912 (2013.01)
 G01N 2333/916 (2013.01)
 G01N 2800/52 (2021.08)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	HI16C1990
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	포스트게놈다부처유전체사업(복지부)
연구과제명	진행성 위암 환자의 유전자 발현 시그니처 기반 치료반응 예측 키트 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	삼성서울병원
연구기간	2016.08.04 ~ 2017.05.03

명세서

청구범위

청구항 1

ARMCX1(Armadillo repeat-containing X-linked protein 1; NCBI 접근 번호: NM_016608), PRKD1(Serine/threonine-protein kinase D1; NCBI 접근 번호: NM_002742) 및 TYK2(Tyrosine Kinase 2; NCBI 접근 번호: NM_003331) 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질을 포함하는, 항암제 반응성 예측용 마커 조성물로서,

상기 항암제는 펌브롤리주맵(Pembrolizumab)인 것을 특징으로 하는, 마커 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 마커 조성물은 UCHL1(Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1; NCBI 접근 번호: NM_004181) 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질을 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 마커 조성물.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 펌브롤리주맵은 위암, 폐암, 피부암, 두경부암, 호지킨 림프종, 신장암 및 요로상피세포암으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 암종의 치료에 이용되는 것을 특징으로 하는, 마커 조성물.

청구항 6

ARMCX1(Armadillo repeat-containing X-linked protein 1; NCBI 접근 번호: NM_016608), PRKD1(Serine/threonine-protein kinase D1; NCBI 접근 번호: NM_002742) 및 TYK2(Tyrosine Kinase 2; NCBI 접근 번호: NM_003331) 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 항암제 반응성 예측용 조성물로서,

상기 항암제는 펌브롤리주맵(Pembrolizumab)인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 조성물은 UCHL1(Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1; NCBI 접근 번호: NM_004181) 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 수준을 측정하는 제제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

제6항에 있어서,

상기 펌브롤리주맵은 위암, 폐암, 피부암, 두경부암, 호지킨 림프종, 신장암 및 요로상피세포암으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 암종의 치료에 이용되는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 11

제6항 또는 제7항에 있어서,

상기 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 제제는 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 센스 및 안티센스 프라이머, 또는 프로브인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 12

제6항 또는 제7항에 있어서,

상기 단백질 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자가 암호화하는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 13

제6항 또는 제7항의 조성물을 포함하는, 항암제 반응성 예측용 키트로서,

상기 항암제는 펌브롤리주맵(Pembrolizumab)인 것을 특징으로 하는, 키트.

청구항 14

피검자 유래의 생물학적 시료에서 ARMCX1(Adrmadillo repeat-containing X-linked protein 1; NCBI 접근 번호: NM_016608), PRKD1(Serine/threonine-protein kinase D1; NCBI 접근 번호: NM_002742) 및 TYK2(Tyrosine Kinase 2; NCBI 접근 번호: NM_003331) 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 항암제 반응성 예측을 위한 정보제공방법으로서,

상기 항암제는 펌브롤리주맵(Pembrolizumab)인 것을 특징으로 하는, 정보제공방법.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 정보제공방법은 UCHL1(Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1; NCBI 접근 번호: NM_004181) 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 수준을 측정하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 정보제공방법.

청구항 16

제14항 또는 제15항에 있어서,

상기 mRNA 수준은 나노스트링 엔카운터 분석(NanoString nCounter analysis), 중합효소연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR), 실시간 중합효소연쇄반응(Real-time PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection assay; RPA), 마이크로어레이(microarray), 및 노던 블롯팅(northern blotting)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방법을 통해 측정되는 것을 특징으로 하는, 정보제공방법.

청구항 17

제14항 또는 제15항에 있어서,

상기 단백질 수준은 웨스턴 블롯팅(western blotting), 방사선면역분석법(radioimmunoassay; RIA), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 효소면역분석법(ELISA), 면역침강법(immunoprecipitation), 유세포분석법(flow cytometry), 면역형광염색법(immunofluorescence), 오우크테로니(ouchterlony), 보체 고정 분석법(complement fixation assay), 및 단백질 칩(protein chip)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방법을 통해 측정되는 것을 특징으로 하는, 정보제공방법.

청구항 18

제14항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 암 환자유래 조직인 것을 특징으로 하는, 정보제공방법.

청구항 19

제18항에 있어서,

상기 조직은 파라핀에 포매된 조직(paraffin-embedded tissue)인 것을 특징으로 하는, 정보제공방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 항암제 반응성 예측용 바이오마커 및 이의 용도에 관한 것으로서, 보다 구체적으로 ARMCX1(Armadillo repeat-containing X-linked protein 1), PRKD1(Serine/threonine-protein kinase D1) 및 TYK2(Tyrosine Kinase 2)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질을 포함하는, PD-1 길항제인 펌브롤리주맙(Pembrolizumab)에 대한 반응성 예측용 마커 조성물, 반응성 예측용 조성물 및 키트, 및 반응성 예측을 위한 정보제공방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 위암(gastric cancer; GC)은 전 세계적으로 가장 많이 발생하는 악성 종양 중 하나이며 암으로 인한 사망의 세 번째 주요 원인으로 알려져 있다. 또한, 대부분의 위암환자가 진행성 단계에 있고 대부분 예후가 매우 좋지 않은 것으로 보고되어 있다. 전이성 위암에서는 백금을 기반으로 한 병용 화학 요법이 표준 치료법으로 간주되지만 많은 환자들이 상기 치료법에 불응성을 가지며, 반응성을 나타내는 환자들도 경우에도 반응 기간이 수 개월 정도로 짧은 것으로 알려져 있다. 위암에서 생존율이 낮은 이유로는 위암이 치료법에 대한 공격성 및 반응성이 상당히 상이한 이질적인 질환이며, 환자 각각에서 임상적 결과 및 예후가 보고된 데이터들과 항상 일치하지 않는다는 것이다. 따라서 위암환자의 항암 치료에서 치료약물에 대한 반응성 및 예후를 미리 예측함으로써 이질적인 특성을 갖는 위암환자에 대하여 가장 적절한 치료법을 제공해주어 불필요한 치료와 관련된 독성을 피하고 궁극적으로 치료효과를 높일 수 있을 것이다.

[0003] 이러한 필요성에 따라, 최근 환자 개인적 요인에 대한 체계화된 분석결과를 바탕으로 적절한 표적항암제 및 치

료방법을 선별할 수 있는 승인된 진단을 의미하는 동반진단(Companion diagnostics)에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 동반진단은 의사의 진단에 따른 처방의 명확한 임상적 근거를 제시할 수 있으며, 환자에게는 적절한 치료법을 제시할 수 있어 암 치료 효율을 높일 수 있을 뿐만 아니라 표적항암제의 오남용을 줄여 국가의 건강보험 재정 건전성에도 기여할 수 있다. 현재 동반진단 시장은 유방암, 폐암, 대장암, 위암, 흑색종 등의 치료분야에서 성장하고 있으며 특히 유방암 및 폐암 분야가 시장 성장을 견인할 것으로 기대되고 있다. 제약사의 신약 개발 비용 절감, 표적치료제에 대한 수요가 높아짐에 따라 동반진단 세계시장은 매년 18%씩 성장하여 2019년에는 58억 달러에 이를 것으로 예상되었다.

[0004] 한편, PD-1(programmed cell death protein 1)에 대한 항체로써 FDA 승인을 받은 펌브롤리주맵(pembrolizumab)은 미세부수체 불안정성(microsatellite unstable; MSI)/DNA dMMR(mismatch repair-deficient) 바이오마커를 갖는 후기 고형 종양 환자의 치료에 사용된다. 최근 20개의 다른 PD-L1 양성인 후기 고형 종양 중 하나를 갖는 475명의 환자에서 진행된 펌브롤리주맵에 대한 비랜덤화, 다기관, 다중 코호트 바스켓 시험결과, 암 유형에 따라 다양한 객관적 반응률(objective response rates; ORRs)이 나타났다. 다수의 종양 유형에 걸쳐 항-PD-1에 대한 반응성을 예측할 수 있는 바이오마커로는 T-세포-염증 유전자 발현 프로파일, PD-L1(programmed death ligand 1) 발현, 및/또는 종양돌연변이부담(tumor mutational burden; TMB)이 있으나, 개별적 암 유형 내에서 더욱 정확하고 항-PD-1 치료에 대한 환자 선별에서 이러한 바이오마커에 대한 임상적 유용성을 평가하기 위하여 더 큰 규모의 연구가 필요하다.

[0005] 위암에서, 단일 군, 다중 코호트의 펌브롤리주맵 2상 시험(KEYNOTE-059)은 11.6%의 객관적 반응률을 보였고, 환자의 2.3%는 완전한 반응을 보였으며, 위암 환자 중 반응군은 비소세포폐암 환자보다 더 적은 비율을 차지하였다(Clinical KEYNOTE-059 Trial. JAMA Oncol 2018; 4: e180013). 비반응군의 높은 비율과 초기 반응을 보인 환자에서 저항성의 출현은 암 면역치료 분야에서 매우 중요한 과제이다. 최근 펌브롤리주맵으로 치료를 받은 전이성 위암 환자들의 분자적 특성에 대한 연구 결과, 미세부수체 불안정성(MSI), 엡스타인-바 바이러스(EBV)-양성, PD-L1-복합양성점수(combined positive score; CPS), TMB, 및 치료에 대한 반응성과 관련이 있는 치료 후 6주째에 순환성 종양 DNA 수준의 감소를 보였다. 비록 T-세포 염증 GEP는 20개의 다양한 고형 종양에 걸쳐 펌브롤리주맵 치료요법의 임상적 효능을 예측하고 PD-1 억제제로부터 혜택을 받을 수 있는 환자를 선별하기 위한 잠재적으로 연관성 있는 바이오마커를 제공하였으나, 전이성 위암 환자에서는 반응성을 예측하지 못하였다.

[0006] 면역치료요법에 대한 예측 바이오마커는 면역 반응 및 종양 생물학의 복잡성 때문에 표적 치료요법에 사용되는 전통적인 바이오마커와는 다르다. 최근에는, 45개의 면역 체크포인트 유전자에 기초한 면역예측점수인 IMPRES가 흑색종 환자에서 ICB에 대한 반응을 예측하기 위해 개발되었다. 종양 생물학의 차이와 환자 혜택의 가능성을 극대화하기 위한 제제의 선택을 가이드하기 위한 임상적 등급의 바이오마커의 필요성을 고려하여, 본 발명자들은 펌브롤리주맵에 대한 반응성을 예측하기 위한 위암-특이적 유전자 발현 세트를 발굴하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 PD-1 억제제 중 하나인 펌브롤리주맵 면역항암제에 대한 반응성 예측용 유전자 바이오마커를 발굴하기 위해 펌브롤리주맵 치료를 받은 위암환자 유래 포르말린 고정 파라핀 포매 조직에서 RNA를 추출하여 나노스트링 분석을 실시하고, 상기 위암환자들의 반응성에 따라 차등적으로 발현된 유전자를 분석한 결과 본 발명에 따른 항암제 반응성 예측용 바이오마커를 발굴하였는바, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.

[0008] 이에, 본 발명은 ARMCX1(Armadillo repeat-containing X-linked protein 1), PRKD1(Serine/threonine-protein kinase D1) 및 TYK2(Tyrosine Kinase 2)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질을 포함하는, 항암제 반응성 예측용 마커 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 ARMCX1, PRKD1 및 TYK2로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 항암제 반응성 예측용 조성물 및 상기 조성물을 포함하는 항암제 반응성 예측용 키트를 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 ARMCX1, PRKD1 및 TYK2로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 항암제 반응성 예측을 위한 정보제공방법을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

[0012] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다

른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 ARMCX1(Armadillo repeat-containing X-linked protein 1; NCBI 접근(accession) 번호: NM_016608), PRKD1(Serine/threonine-protein kinase D1; NCBI 접근(accession) 번호: NM_002742) 및 TYK2(Tyrosine Kinase 2; NCBI 접근(accession) 번호: NM_003331)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질을 포함하는, 항암제 반응성 예측용 마커 조성물을 제공한다.
- [0014] 본 발명의 일구현예로, 상기 마커 조성물은 UCHL1(Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1; NCBI 접근(accession) 번호: NM_004181) 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질을 더 포함할 수 있다.
- [0015] 또한, 본 발명은 ARMCX1(Armadillo repeat-containing X-linked protein 1; NCBI 접근(accession) 번호: NM_016608), PRKD1(Serine/threonine-protein kinase D1; NCBI 접근(accession) 번호: NM_002742) 및 TYK2(Tyrosine Kinase 2; NCBI 접근(accession) 번호: NM_003331)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 항암제 반응성 예측용 조성물을 제공한다.
- [0016] 본 발명의 일구현예로, 상기 조성물은 UCHL1(Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1; NCBI 접근(accession) 번호: NM_004181) 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 수준을 측정하는 제제를 더 포함할 수 있다.
- [0017] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는, 항암제 반응성 예측용 키트를 제공한다.
- [0018] 본 발명의 일구현예로, 상기 항암제는 PD-1(Programmed cell death protein 1) 길항제일 수 있다.
- [0019] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 PD-1 길항제는 펌브롤리주맵(Pembrolizumab)일 수 있다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 펌브롤리주맵은 위암, 폐암, 피부암, 두경부암, 호지킨 림프종, 신장암 및 요로상피세포암으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 암종의 치료에 이용되는 것일 수 있다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 제제는 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 센스 및 안티센스 프라이머, 또는 프로브일 수 있다.
- [0022] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 단백질 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자가 암호화하는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체일 수 있다.
- [0023] 또한, 본 발명은 ARMCX1(Armadillo repeat-containing X-linked protein 1; NCBI 접근(accession) 번호: NM_016608), PRKD1(Serine/threonine-protein kinase D1; NCBI 접근(accession) 번호: NM_002742) 및 TYK2(Tyrosine Kinase 2; NCBI 접근(accession) 번호: NM_003331)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 항암제 반응성 예측을 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [0024] 본 발명의 일구현예로, 상기 정보제공방법은 UCHL1(Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1; NCBI 접근(accession) 번호: NM_004181) 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 수준을 측정하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 mRNA의 수준은 나노스트링 엔카운터 분석(NanoString nCounter analysis), 중합효소연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR), 실시간 중합효소연쇄반응(Real-time PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection assay; RPA), 마이크로어레이(microarray), 및 노던 블롯팅(northern blotting)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방법을 통해 측정될 수 있다.
- [0026] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 단백질 수준은 웨스턴 블롯팅(western blotting), 방사선면역분석법(radioimmunoassay; RIA), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 효소면역분석법(ELISA), 면역침강법(immunoprecipitation), 유세포분석법(flow cytometry), 면역형광염색법(immunofluorescence), 오우크테로니(ouchterlony), 보체 고정 분석법(complement fixation assay), 및 단백질 칩(protein chip)으로 이루어진 군 으로부터 선택되는 1종 이상의 방법을 통해 측정될 수 있다.

[0027] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 생물학적 시료는 암 환자유래 조직일 수 있다.

[0028] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 조직은 파라핀에 포매된 조직(paraffin-embedded tissue)일 수 있다.

발명의 효과

[0029] 본 발명자들은 펙브롤리주맵 면역항암제 치료를 받은 위암환자 유래 조직샘플을 이용해 상기 항암제에 대한 반응성 예측용 유전자 세트를 발굴하였고, 아시아 암 연구 그룹(ACRG)의 마이크로레이 데이터 및 TCGA(The Cancer Genome Atlas) 코호트의 RNA 서열분석 결과를 이용해 상기 마커들의 유효성을 검증하였는바, 본 발명에 따른 유전자 마커는 환자유래 포르말린 고정 파라핀 포매 조직을 활용하여 분석하기 때문에 별도의 샘플 채취가 필요 없어 분석이 편리하며, 상기 면역항암제에 대한 반응성을 미리 예측할 수 있어 최적의 치료법 선택을 위한 정보를 제공할 수 있으므로 임상 진단 분야에서 유용하게 이용될 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1은 본 발명에 따른 펙브롤리주맵에 대한 반응성 예측용 유전자마커 발굴을 위한 연구 순서를 간략히 도시한 것이다.

도 2는 펙브롤리주맵에 대한 반응성 예측 유전자 시그니처 및 본 발명에 따른 IMAGiC 점수를 분석한 결과로서, 도 2a는 고정 종양의 반응 평가 기준(Response Evaluation Criteria in Solid Tumors; RECIST)에 근거하여 분류된 반응군(Response) 및 비반응군(Nonresponse) 간에 차등적으로 발현되는 유전자 분석 결과를 보여주는 volcano plot 결과이고, 도 2b는 상기 차등적으로 발현된 유전자들에 대한 농축 분석(Enrichment analysis) 결과를 보여주는 것이며, 도 2c는 환자를 2개 군으로 분류하기 위한 IMAGiC 점수의 컷오프 커브, 및 펙브롤리주맵에 대한 반응성 예측용 IMAGiC 점수의 AUC 커브를 보여주는 것이다.

도 3은 IMAGiC 모델, RECIST 그룹, 엡스타인-바 바이러스 감염여부(EBV) 및 미세부수체 불안정성 여부(MSI) 간의 관련성을 분석한 결과로서, 도 3a는 IMAGiC 모델, RECIST 군, EBV 및 MSI 간의 상관관계를 분석한 결과를 나타낸 것이고, 도 3b 내지 도 3f는 각각 RECIST 군, EBV 서브타입, MSI 서브타입, 돌연변이 부하(Mutational Load; ML) 및 PD-L1 CPS(combined positive score) 상태 간에 IMAGiC 점수를 비교한 Boxplot 결과이다.

도 4는 TCGA 코호트에서 IMAGiC 모델을 검증한 분석 결과로서, 도 4a는 TCGA 코호트에서의 돌연변이 스펙트럼을 보여주는 결과이고, 도 4b는 MSI 서브타입 간에 IMAGiC 점수를 비교한 Boxplot 결과이며, 도 4c는 종양 돌연변이 부하를 통해 분류된 과돌연변이된 그룹과 IMAGiC 점수를 비교한 Boxplot 결과이다.

도 5는 ACRG 코호트에서 IMAGiC 모델을 검증한 분석 결과로서, 도 5a는 ACRG 코호트에서 IMAGiC 그룹(Responder, Nonresponder)간에 전체생존율(Overall survival) 및 무병생존율(Disease-free survival) 차이를 비교한 결과이고, 도 5b 및 도 5c는 각각 ACRG 서브타입(MSI, EMT, MSS/TP53+, MSS/TP53-) 및 MSI 서브타입 간의 IMAGiC 점수를 비교한 Boxplot 결과이다.

도 6은 qRT-PCR 플랫폼을 이용하여 IMAGiC 모델의 재현성을 검증한 결과로서, 도 6a는 IMAGiC 모델, RECIST 군, EBV 및 MSI 간의 상관관계를 분석한 결과를 나타낸 것이고, 도 6b 내지 도 6d는 RECIST 군, MSI 서브타입, 및 ESV 서브타입 간의 IMAGiC 점수를 비교한 Boxplot 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 본 발명자들은 면역항암제인 펙브롤리주맵에 대한 반응성 예측을 위한 바이오마커를 발굴하기 위해 연구 노력한 결과, ARMCX1, PRKD1, TYK2 및 UCHL1 유전자를 바이오마커로 발굴하였는바, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.

[0032] 이에, 본 발명은 ARMCX1(Armadillo repeat-containing X-linked protein 1; NCBI 접근(accession) 번호: NM_016608), PRKD1(Serine/threonine-protein kinase D1; NCBI 접근(accession) 번호: NM_002742) 및 TYK2(Tyrosine Kinase 2; NCBI 접근(accession) 번호: NM_003331)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질을 포함하는, 항암제 반응성 예측용 마커 조성물을 제공한다.

[0033] 또한, 본 발명은 ARMCX1(Armadillo repeat-containing X-linked protein 1; NCBI 접근(accession) 번호: NM_016608), PRKD1(Serine/threonine-protein kinase D1; NCBI 접근(accession) 번호: NM_002742) 및 TYK2(Tyrosine Kinase 2; NCBI 접근(accession) 번호: NM_003331)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 항암제 반응성 예측용

조성물, 및 상기 조성물을 포함하는 암 환자의 항암제 반응성 예측용 키트를 제공한다.

- [0034] 본 발명에 있어서, 상기 암 환자의 항암제 반응성 예측용 마커로써 UCHL1(Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1; NCBI 접근(accession) 번호: NM_004181) 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질을 더 포함할 수 있다.
- [0035] 본 발명에서는 구체적인 실시예를 통해 상기 4종의 유전자 바이오마커를 발굴하고, 구체적으로 위암환자에서 펌브롤리주맙 치료에 대한 반응성 예측 용도로써 유효성을 검증하였다.
- [0036] 본 발명의 일실시예에서는, 펌브롤리주맙에 대한 반응성과 관련하여 21명의 위암환자 유래 위암조직으로부터 유전자 발현 프로파일링을 분석하고, 고형 종양의 반응 평가 기준(Response Evaluation Criteria in Solid Tumors; RECIST)에 근거하여 반응군 및 비반응군 사이에서 유의하게 차등적으로 발현된 유전자 분석을 통해 최종 4개 유전자인 PRKD1, ARMCX1, TYK2 및 UCHL1를 발굴하였다(실시예 2 참조).
- [0037] 본 발명의 다른 실시예에서는 펌브롤리주맙에 대한 반응성을 예측할 수 있는 모델을 구축하기 위해 상기 선별된 4개 유전자의 mRNA 발현 수준을 이용하여 선형 회귀 분석을 실시하여 본 발명에 따른 펌브롤리주맙에 대한 반응성 예측용 IMAGiC 모델을 구축하였다. 나아가 상기 모델의 민감도, 특이도 및 정확도를 분석하였고, 펌브롤리주맙에 대한 IMAGiC 점수 및 RECIST 그룹에 기반하여 IMAGiC 그룹으로써 반응군(Responder) 및 비반응군(Nonresponder)으로 분류하였다. 동일한 코호트에서 IMAGiC 점수는 RECIST 군(CR, PR, SD, PD)($P=0.0057$), EBV 감염 상태($P=0.048$) 및 종양 돌연변이 하중(Mutational Load; ML)($P=0.023$)과 유의한 상관관계가 있는 것을 확인하였다(실시예 3 참조).
- [0038] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 각각 TCGA(The Cancer Genome Atlas) 코호트의 RNA-시퀀싱 데이터 및 아시아 암 연구 그룹(Asia Cancer Research Group; ACRG) 코호트의 mRNA 발현 어레이 결과를 이용하여 본 발명에 따른 IMAGiC 모델의 유효성을 검증하였다. 보다 구체적으로, TCGA 코호트에서는 IMAGiC은 TCGA 분자 아형($P=1.21E-04$), MSI($P=0.01$), EBV($P=0.09$) 및 TMB 상태($P=1.19E-05$)와 유의한 상관관계가 있는 것으로 나타났으며, IMAGiC 모델이 무병생존율, ACRG 분자 서브타입 및 MSI와 관련이 있는 것을 확인하였다(실시예 4 참조).
- [0039] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 다른 기술적 방법인 qRT-PCR을 이용하여 IMAGiC 모델의 재현성을 평가하였으며, 그 결과 qRT-PCR에 의한 IMAGiC 그룹은 RECIST군, EBV 및 MSI와도 높은 상관관계가 있는 것으로 나타났다. 나아가 니블루맙에 대한 임상 코호트를 사용하여 IMAGiC qRT-PCR의 결과를 검증한 결과 IMAGiC의 정확도가 100%로 나타났다(실시예 5 참조).
- [0040] 본 발명에서 사용되는 용어, “항암제”란, 보다 바람직하게는 면역항암제로써 면역시스템을 자극하여 항암효과를 유도하는 암 치료제를 의미하여, 본원발명에서는 보다 바람직하게 PD-1 길항제를 의미하고, 더욱 바람직하게 상기 PD-1 길항제는 펌브롤리주맙(Pembrolizumab, trade name; Keytruda)일 수 있다.
- [0041] 본 발명에서 사용되는 용어, “길항제(antagonist)”는 어떤 생체작용물질의 수용체 결합에 길항적으로 작용하지만 자신은 각 수용체를 통한 생리작용을 나타내지 않는 물질을 의미하며, 본 발명의 PD-1 길항제인 펌브롤리주맙은 면역세포 표면에 발현되어 있는 PD-1에 결합하여 이의 리간드인 암세포 표면에 발현하는 PD-L1 또는 PD-L2와의 상호작용을 저해하는 기능을 갖는다.
- [0042] 상기 면역항암제에 의한 면역치료 중 수동적 면역치료는 체외에서 다량으로 만들어진 면역반응 성분 예컨대, 면역세포, 항체, 사이토카인 등을 암 환자에게 주입하여 암세포를 공격하는 치료방법이고, 능동적 면역치료는 개인의 항체와 면역세포들을 능동적으로 활성화 또는 생산시키게 하여 암세포를 공격하는 치료방법이다. 본 발명은 이러한 면역치료에 대하여 암 환자의 펌브롤리주맙 치료 시 이에 대한 반응성을 예측하기 위한 바이오마커 및 이의 용도에 관한 것이다.
- [0043] 본 발명에 있어서, 상기 펌브롤리주맙은 위암, 폐암, 피부암, 두경부암, 호지킨 림프종, 신장암 및 요로상피세포암으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 암종의 치료에 이용되는 것일 수 있고, 보다 바람직하게는 위암 치료에 이용되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0044] 본 발명에서 있어서 “항암제 반응성 예측”이란, 환자가 면역 항암제에 대해 선호적으로 또는 비선호적으로 반응할지 여부를 예측하는 것, 또는 항암제에 대한 내성의 위험성을 예측하는 것, 면역치료 후 환자의 예후 즉, 재발, 전이, 생존, 또는 무병생존 등을 예측하는 것을 의미한다. 본 발명에 따른 치료 반응성 예측을 위한 바이오마커는 암 환자, 보다 바람직하게는 위암환자에 대한 가장 적절한 면역치료 방식을 선택하도록 하기 위한 정보를 제공할 수 있다.

- [0045] 상기 항암제 반응성 예측용 마커 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 제제는 mRNA에 상보적으로 결합하는 센스 및 안티센스 프라이머, 또는 프로브일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0046] 본 발명에서 사용되는 용어, “프라이머”란 DNA 합성의 기시점이 되는 짧은 유전자 서열로써, 진단, DNA 시퀀싱 등에 이용할 목적으로 합성된 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 상기 프라이머들은 통상적으로 15 내지 30 염기쌍의 길이로 합성하여 사용할 수 있으나, 사용 목적에 따라 달라질 수 있으며, 공지된 방법으로 메틸화, 캡화 등으로 변형시킬 수 있다.
- [0047] 본 발명에서 사용되는 용어, “프로브”란 효소 화학적인 분리정제 또는 합성과정을 거쳐 제작된 수 염기 내지 수백 염기길이의 mRNA와 특이적으로 결합할 수 있는 핵산을 의미한다. 방사성 동위원소, 효소, 또는 형광체 등을 표지하여 mRNA의 존재 유무를 확인할 수 있으며, 공지된 방법으로 디자인하고 변형시켜 사용할 수 있다.
- [0048] 상기 단백질 수준을 측정하는 제제는 유전자가 암호화하는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0049] 본 발명에서 사용되는 용어, “항체”는 면역학적으로 특정 항원과 반응성을 갖는 면역글로불린 분자를 포함하며, 단클론(monoclonal) 항체 및 다클론(polyclonal) 항체를 모두 포함한다. 또한, 상기 항체는 키메라성 항체(예를 들면, 인간화 뮤린 항체) 및 이중결합 항체(예를 들면, 양특이성 항체)와 같은 유전공학에 의해 생산된 형태를 모두 포함한다.
- [0050] 본 발명의 항암제 반응성 예측용 키트는 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성성분 조성물, 용액 또는 장치로 구성될 수 있다.
- [0051] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 피검자 유래의 생물학적 시료에서 ARMCX1(Armadillo repeat-containing X-linked protein 1), PRKD1(Serine/threonine-protein kinase D1) 및 TYK2(Tyrosine Kinase 2) 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 수준을 측정하는 단계를 포함하는 항암제 반응성 예측을 위한 정보 제공방법을 제공한다.
- [0052] 상기 mRNA 수준은 당업계에 알려진 통상적인 방법에 따라 나노스트링 엔카운터 분석(NanoString nCounter analysis), 중합효소연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR), 실시간 중합효소연쇄반응(Real-time PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection assay; RPA), 마이크로어레이(microarray), 및 노던 블롯팅(northern blotting)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방법을 통해 측정될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0053] 상기 단백질 수준은 당업계에 알려진 통상적인 방법에 따라 웨스턴 블롯팅(western blotting), 방사선면역분석법(radioimmunoassay; RIA), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 효소면역분석법(ELISA), 면역침강법(immunoprecipitation), 유세포분석법(flow cytometry), 면역형광염색법(immunofluorescence), 오우크테로니(ouchterlony), 보체 고정 분석법(complement fixation assay), 및 단백질 칩(protein chip)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방법을 통해 측정되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0054] 상기 생물학적 시료는 암 환자유래 조직이며, 보다 바람직하게는 포르말린 등의 고정액으로 고정하여 파라핀에 포매한 조직을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0056] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- [0058] **[실시예]**
- [0059] **실시예 1. 실험준비 및 실험방법**
- [0060] **1-1. 대상 위암환자 선정**
- [0061] 본 실시예에서는 2013년부터 2017년까지 펌브롤리주맵(pembrolizumab)에 대한 임상 반응을 평가하기 위해 예비 단일 부위, 2상 임상시험에 등록된 61명의 전이성 위암(metastatic gastric cancer; mGC) 환자를 모집하였다. 그 중에서 원발성 종양 조직의 이용 가능성과 펌브롤리주맵에 대한 임상적 반응에 근거하여 21명의 환자 케이스를 선별하였다. 하기 표 1에 정리하여 나타낸 바와 같이, 선별된 환자들의 평균 연령은 57세(26-78세)였고, 미세부수체 불안정성군(microsatellite instability; MSI) 위암환자는 4명(19.05%), 엡스타인-바 바이러스(EBV)-양성 위암환자는 2명(9.52%)이 포함되어 있었으며, 인구 통계학적 특징 및 치료 결과를 포함한 임상 데이터는

의료 기록을 검토하여 얻었다.

표 1

[0062]

	Patients (n=21)
Age (years)	
	57 (26-78)
Sex	
Male	16 (76.19%)
Female	5 (23.81%)
MSI	
MSI	4 (19.05%)
MSS	17 (80.95%)
EBV	
Positive	2 (9.52%)
Negative	19 (90.48%)
Response	
CR	2 (9.52%)
PR	4 (19.05%)
SD	5 (23.81%)
PD	10 (47.62%)

[0064]

1-2. RNA 추출

[0065]

포르말린으로 고정된 파라핀-포매된 조직으로부터 총 RNA를 분리하기 위해, 각 위암환자 유래 조직 블록을 4 μm 두께의 절편으로 절단하였다. 이후 제조사의 지시에 따라 RNeasy FFPE 키트(Qiagen, Germany)를 사용하여 RNA를 분리하였다. 보다 상세하게, 절단된 조직을 탈파라핀화하고, 단백질분해효소 K 처리, 컬럼상의 DNase 분해를 거쳐 RNase-free water를 이용하여 RNA를 추출하였다. 상기 방법으로 분리한 total RNA 샘플은 사용 전까지 -80℃에 보관하였으며, RNA 농도는 NanoDrop(Thermo Fisher Scientific, USA)을 이용하여 측정하였다.

[0067]

1-3. 나노스트링 분석을 통한 유전자 발현 프로파일링

[0068]

유전자의 발현 프로파일링을 위해, 상기 실시예 1-2에 따라 위암 조직 샘플에서 분리한 RNA를 이용하여 나노스트링 분석(NanoString Technologies, Inc, Seattle, USA)을 실시하였다. 상기 분석을 위해, 본 발명자들은 중간염 시그니처 및 종양 면역의 포괄적인 분석에 의해 확인된 숙주면역반응 유전자와 관련된 168개의 유전자에 대한 프로브를 제작하였다. 대조군으로는 11개의 하우스키핑(housekeeping) 유전자 및 14개의 기술적인 내부 대조군 유전자를 추가하였다. 이어서 표준 프로토콜 'Setting up 12 nCounter Assays (MAN-C0003-03, 2008-2013)'에 따라 나노스트링 분석을 수행하였다. 18시간 동안 배양하여 혼성화 반응을 유도하였으며, NanoString Technologies의 nSolver 소프트웨어를 이용하여 데이터를 분석하였다. 하우스키핑 유전자 및 내부 대조군 유전자를 이용하여 데이터를 정규화하고 nSolver 소프트웨어(version4.0)에서 log10 스케일로 변환하였다.

[0070]

1-4. 웹브롤리주맵에 대한 반응에 따라 차등적으로 발현된 유전자 분석

[0071]

웹브롤리주맵에 대한 반응성을 예측할 수 있는 유전자 시그니처를 발굴하기 위해, nSolver 소프트웨어를 이용하여 차등적으로 발현되는 유전자(differentially expressed gene; DEG) 분석을 실시하였다. 웹브롤리주맵에 대한 반응성이 있는 그룹과 반응성이 없는 그룹을 비교함으로써 차등적으로 발현되는 유전자를 확인하기 위해, 컷오프 값으로 P 값은 < 0.01로 설정하였다.

[0073]

1-5. 웹브롤리주맵에 대한 반응성 예측 모델의 개발 및 TCGA와 ACRG 코호트에서의 유효성 검증

[0074]

웹브롤리주맵에 대한 예측 모델을 구축하기 위해, 유의하게 상이한 발현 패턴을 보인 유전자의 mRNA 발현 수준 및 위암 조직의 PD-L1 CPS를 선형 회귀 모델을 사용하여 분석하였다. 예측 모델은 ROC 곡선의 아래 면적(AUC)으로 민감도와 특이도를 계산함으로써 평가하였다. 전이성 위암환자들을 반응군(Response) 및 비반응군(no response)으로 분류하기 위한 컷오프 값은 AUC 패키지에서 정확성 기능에 의해 정의되었다.

[0075]

나아가 본 발명에 따른 예측 모델을 평가하기 위해, 교차 검증을 10회 수행하였고, 각 검증 결과에 대하여 RMSE(root mean squared error)를 계산하였다. 또한 MSI, EBV-양성 및 TMB가 면역치료에 대한 반응성과 밀접한

연관이 있다고 알려져 있으므로, TCGA의 RNA 서열분석 데이터 및 ACRG의 마이크로어레이 데이터를 이용해 본 발명의 결과를 검증하였다. ComBat 함수는 유효성 검증 데이터와 테스트 데이터가 서로 다른 플랫폼을 가지기 때문에 sva 패키지를 사용하여 유전자 발현 데이터를 조정하는데 이용하였다. 모든 통계 분석 및 시각화된 플롯은 R 프로그램(R 버전 3.4.4)에서 수행되었다. 총 돌연변이 비율은 메가베이스 당 체세포 비동의 단일 뉴클레오타이드 변이체(single nucleotide variant; SNV) 돌연변이의 수로 계산되었으며, 높은 돌연변이 부하(mutation load; ML)에 대한 임계값은 상위 삼분위수로 설정되었다.

[0077] 1-6. 정량적 실시간 중합효소연쇄반응을 이용한 검증

[0078] 다른 기술적 플랫폼으로 본 발명에 따른 IMAGiC 모델의 재현성을 평가하기 위해, 5 μ l 2X Taqman PreAmp Master Mix, 4 μ l cDNA 샘플, 및 1 μ l 프라이머/프로브를 포함하는 한 반응 당 최종 10 μ l 볼륨의 반응 용액으로 384-웰 플레이트에서 7900HT 서열 검출 시스템(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 이용해 정량적 real-time PCR을 수행하는 조건을 설정하였다. PCR 증폭은 하기 조건에 따라 진행하였으며 동일 샘플을 각각 독립적인 3개 웰에서 증폭되도록 하였다: 50°C에서 2분 및 94°C에서 10분, 이어서 95°C에서 15초 및 60°C에서 60초를 40사이클 반복.

[0080] 1-7. PD-L1에 대한 면역조직화학염색법

[0081] 포르말린으로 고정된 파라핀-포매된 조직(FFPE) 샘플의 각 대표되는 섹션을 이용해 면역조직화학염색(IHC)을 실시하였다. PD-L1의 염색은 FDA-승인된 단클론 마우스 항체인 PD-L1 22C3 pharmDx(Dako, Carpinteria, CA)를 사용하여 수행하였다. 또한 숙련된 병리학자(KMK)를 통해 PD-L1으로 염색된 IHC 슬라이드 결과를 해석하였다: CPS는 PD-L1으로 염색된 세포(종양세포, 림프구, 대식세포)의 수를 합하고 그 결과를 총 생존한 종양세포의 수로 나눈 다음 100을 곱한 후 PD-L1 IHC 22C3 pharmDx 사용 지침에 따라 평가하였다(https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/29219_pd-l1-ihc-22C3-pharmdx-gastric-interpretation-manual_us.pdf). PD-L1 IHC는 결과는 점수가 1 이상이면 양성으로, 1 미만이면 음성으로 해석하였다.

[0083] 실시예 2. 펩브롤리주맵에 대한 반응에서 차등적으로 발현된 유전자 확인

[0084] 펩브롤리주맵에 대한 반응성과 관련하여 21명의 위암환자 유래 위암조직으로부터 유전자 발현 프로파일링을 분석하였다. 고형 종양의 반응 평가 기준(Response Evaluation Criteria in Solid Tumors; RECIST)에 근거하여 펩브롤리주맵에 대한 반응성에 따라 4개 군으로 분류하였으며, 그 결과 완전 반응(Complete response; CR)은 4 케이스, 부분 반응(partial response; PR)은 4 케이스, 암 진행 정체(stable disease; SD)은 5 케이스, 및 암의 진행(progressive disease; PD)은 10 케이스로 분류되었다.

[0085] 펩브롤리주맵에 대한 반응성 예측 시그니처 유전자를 선별하기 위해, nSolver 소프트웨어를 사용하여 도 2a에서 볼 수 있는 바와 같이 DEG 분석을 실시하였다. 이후 모든 차등적으로 발현된 유전자(DEGs)들을 이용하여 농축 분석(Enrichment analysis)을 수행하였다(P 값 < 0.05). 그 결과, 도 2b에 나타난 바와 같이 모든 DEGs는 항원 처리 및 제시(Antigen processing and presentation)와 선천면역반응(Innate immune response)을 비롯하여 EBV 감염(EBV infection) 및 면역반응(Immune response)과 가장 유의하게 관련이 있었으며, 이는 펩브롤리주맵에 대한 반응성을 예측하는데 가장 중요한 인자들이 면역 반응에 관련되어 있음을 의미하는 것이다.

[0086] 이에 최종적으로, 도 2a의 DEG 분석 결과를 통해 펩브롤리주맵 치료에 대하여 반응군 및 비반응군 사이에서 유의하게 차등적으로 발현된 4개 유전자인 UCHL1, PRKD1, ARMCX1 및 TYK2를 선별하였다(P < 0.01).

[0088] 실시예 3. 펩브롤리주맵에 대한 반응성 예측용 IMAGiC 모델의 구축

[0089] 펩브롤리주맵에 대한 반응성을 예측할 수 있는 모델을 구축하기 위해, DEG로부터 선별된 4개 유전자의 mRNA 발현 수준을 이용하여 선형 회귀 분석을 실시하였다. 또한 PD-L1의 발현은 펩브롤리주맵 반응에 대한 중요한 바이오마커이므로, IMAGiC에 또한 PD-L1 CPS를 이용하였다. 나아가 상기 방법에 따라 구축된 IMAGiC 모델의 성능을 평가하기 위해 동일한 환자 코호트에서 상기 모델을 검증하였다. 그 결과, 도 2c에 나타난 바와 같이 모든 IMAGiC 그룹은 펩브롤리주맵에 대한 반응에 완벽하게 매치되었다. IMAGiC 모델의 민감도(Sensitivity), 특이도(Specificity) 및 정확도(Accuracy)는 AUC 방법을 사용하여 계산되었으며 모두 100%인 것으로 확인되었다. 나아가 선택된 데이터의 편향을 줄이고 IMAGiC 모델의 성능을 향상시키기 위하여, 10배 교차 검증을 수행하였다. 21개의 모든 샘플을 사용하여 IMAGiC 모델을 구축하고 각 교차 검증 단계마다 10개 그룹으로 분류하였다; 10개 그룹 중 9개가 테스트에 사용되고 나머지 그룹은 유효성 검사에 사용되었다. 평균 RMSE는 1.751였다.

[0090] IMAGiC 그룹은 펄브롤리주맵에 대한 IMAGiC 점수 및 RECIST 그룹에 기반하여 개발되었으며, IMAGiC 점수의 컷오프 값은 AUC 패키지의 정확도 기능을 사용하여 2.5069로 설정하였다. 최종적으로, 전이성 위암환자들은 IMAGiC에 근거하여 반응군(Responder) 및 비반응군(Nonresponder)으로 분류되었다. 도 3a에 나타낸 바와 같이 IMAGiC 점수는 PD-L1 CPS ($r^2=0.64$), RECIST군 ($r^2=0.83$) 및 EBV 감염 상태 ($r^2=0.56$)와 상관관계가 있는 것으로 나타났다. 또한, 각각 도 3b 내지 도 3f에서 볼 수 있는 바와 같이 IMAGiC 점수는 RECIST 군(CR, PR, SD, PD)($P=0.0057$), EBV 감염 상태($P=0.048$) 및 종양 돌연변이 하중(Mutational Load; ML)($P=0.023$)과 유의한 상관관계가 있는 것을 확인하였으며, 이에 반해 MSI 서브타입($P=0.14$) 및 PD-L1 CPS($P=0.095$)와는 유의한 관련성이 없는 것으로 나타났다.

[0092] **실시예 4. TCGA 및 ACRG 코호트에서 IMAGiC의 분석**

[0093] 종래 PD-1 봉쇄가 MSI 및 EBV-양성 종양뿐만 아니라 높은 ML을 갖는 종양에 대해서도 효과적인 것으로 보고되었으므로, 본 발명자들은 TCGA RNA-시퀀싱 데이터($n=260$) 및 ACRG mRNA 발현 어레이 결과($n=300$)에 대하여 IMAGiC 예측 모델을 적용하여 그 유효성을 검증하고자 하였다.

[0094] 먼저, TCGA 그룹에 포함된 위암 서브타입을 분석한 결과, 도 4a에 나타낸 바와 같이 MSI 위암이 59 케이스(22.7%), EBV-양성 위암이 24 케이스(9.2%), TMB-높은 하위유형 위암이 61케이스(23.5%)가 포함되어 있었으며, 총 돌연변이율은 4가지 분자적 아형에서 구별되었다. 나아가 IMAGiC과 TCGA 코호트에 포함된 각 서브타입 위암 간의 상관관계를 분석한 결과, 하기 표 2에 나타낸 바와 같이 IMAGiC은 TCGA 분자 아형($P=1.21E-04$), MSI($P=0.01$), EBV($P=0.09$) 및 TMB 상태($P=1.19E-05$)와 유의한 상관관계가 있는 것으로 나타났다. 즉, MSI 또는 EBV-양성 위암을 갖는 많은 환자들이 IMAGiC에 의해 반응군으로 분류되었다. 또한, 도 4b 및 도 4c에서 볼 수 있는 바와 같이 MSI 및 TMB와 관련된 위암에서 IMAGiC 점수는 미세부수체 안정(microsatellite-stable; MSS) 및 비-TMB 그룹의 점수보다 유의하게 더 높게 나타난 것을 확인하였다.

표 2

IMAGiC Group	Responders	Non-responders	p-value
	(n=125)	(n=135)	
Sex			0.7102
Male	74 (46.84%)	84 (53.16%)	
Female	51 (50.00%)	51 (50.00%)	
TCGA subtype			1.21E-04
EBV	16 (66.67%)	8 (33.33%)	
MSI	37 (62.71%)	22 (37.29%)	
CIN	60 (47.62%)	66 (52.38%)	
GS	12 (23.53%)	39 (76.47%)	
MSI			0.0159
MSI-H	37 (62.71%)	22 (37.29%)	
MSS	88 (43.78%)	113 (56.22%)	
EBV			0.0894
Positive	16 (66.67%)	8 (33.33%)	
Negative	109 (46.19%)	127 (53.81%)	
Total mutation rate*	21.2401 (±34.4094)	12.6771 (±25.5755)	1.19E-05

[0097] 한편, ACRG 코호트의 경우에는 하기 표 3에 나타낸 바와 같이 MSI 위암이 68 케이스(22.7%), EBV-양성 위암이 18 케이스(6.0%)가 포함되어 있었다. 또한 IMAGiC 그룹인 반응군(Responder) 및 비반응군(Nonresponder) 간의 전체생존율(Overall survival) 및 무병생존율(Disease-free survival) 차이를 비교하고, ACRG 분자 서브타입(MSI, EMT, MSS/TP53+, MSS/TP53-) 및 MSI(MSI-H, MSS) 서브타입 그룹에서 IMAGiC 점수를 비교한 결과, 도 5a 내지 도 5c에 나타낸 바와 같이 IMAGiC 모델이 무병생존율, ACRG 분자 서브타입($P=1.96E-08$) 및 MSI($P=0.006$)와 관련이 있는 것을 확인하였다.

표 3

IMAGiC Group	Responders	Non-responders	p-value
	(n=118)	(n=182)	

Sex			0.0396
Male	87 (43.72%)	112 (56.28%)	
Female	31 (30.69%)	70 (69.31%)	
ACRG subtype			1.96E-08
MSI	37 (54.41%)	31 (45.59%)	
EMT	0 (0.00%)	46 (100.00%)	
MSS/TP53+	31 (39.24%)	48 (60.76%)	
MSS/TP53-	50 (46.73%)	57 (53.27%)	
MSI			0.0059
MSI-H	37 (54.41%)	31 (45.59%)	
MSS	81 (34.91%)	151 (65.09%)	
EBV			0.1116
Positive	3 (16.67%)	15 (83.33%)	
Negative	106 (41.25%)	151 (58.75%)	
NA	9 (36.00%)	16 (64.00%)	

실시예 5. qRT-PCR을 이용한 IMAGiC의 재현 및 검증

임상 실무에서의 이용을 위해, 본 발명자들은 다른 기술적 방법으로 IMAGiC 모델의 재현성을 평가하고자 하였다. 이를 위해, 동일한 코호트에서 24명의 환자 유래 mRNA를 사용하여 qRT-PCR을 수행하였다. 그 결과, 도 6a 내지 도 6d에 나타난 바와 같이 qRT-PCR에 의한 IMAGiC 그룹은 RECIST군($r^2=0.82$), EBV($r^2=0.48$) 및 MSI($r^2=0.66$)와도 높은 상관관계가 있는 것으로 나타났다. IMAGiC의 재현성에 대한 정확도는 87.5%였다(양의 예측 값, 87.5%; 음의 예측 값, 12.5%)였다.

나아가 전이성 위암을 갖는 다른 환자군에서 IMAGiC qRT-PCR의 결과를 검증하기 위하여, 본 발명자들은 니볼루맵(nivolumab)(Opdivo, Bristol-Myers Squibb Company Inc.)으로 진행 중인 임상시험에서 확보된 17개의 환자 샘플을 이용하였다. 하기 표 4에 나타난 바와 같이 모든 케이스는 EBV-음성이었으며, 대부분(94.1%)은 MSS 및 PD-L1 CPS 음성이었다. MSI, EBV-양성 및 양성 PD-L1 CPS가 펄스블리주맵에 대한 반응성과 관련이 있다는 최근의 임상 시험 및 연구 결과들과 일치하게, 대부분의 케이스는 RECIST군에 근거하여 IMAGiC 그룹에서 비반응군으로 분류되었다. 또한 IMAGiC qRT-PCR 모델이 원래의 것과 동일한 정확도를 갖는지 여부를 조사하기 위해 상기 니볼루맵 코호트를 사용하여 IMAGiC의 정확도를 계산했으며 그 결과 정확도가 100%로 나타났다(양의 예측 값, 100 %; 음의 예측 값, 0%).

표 4

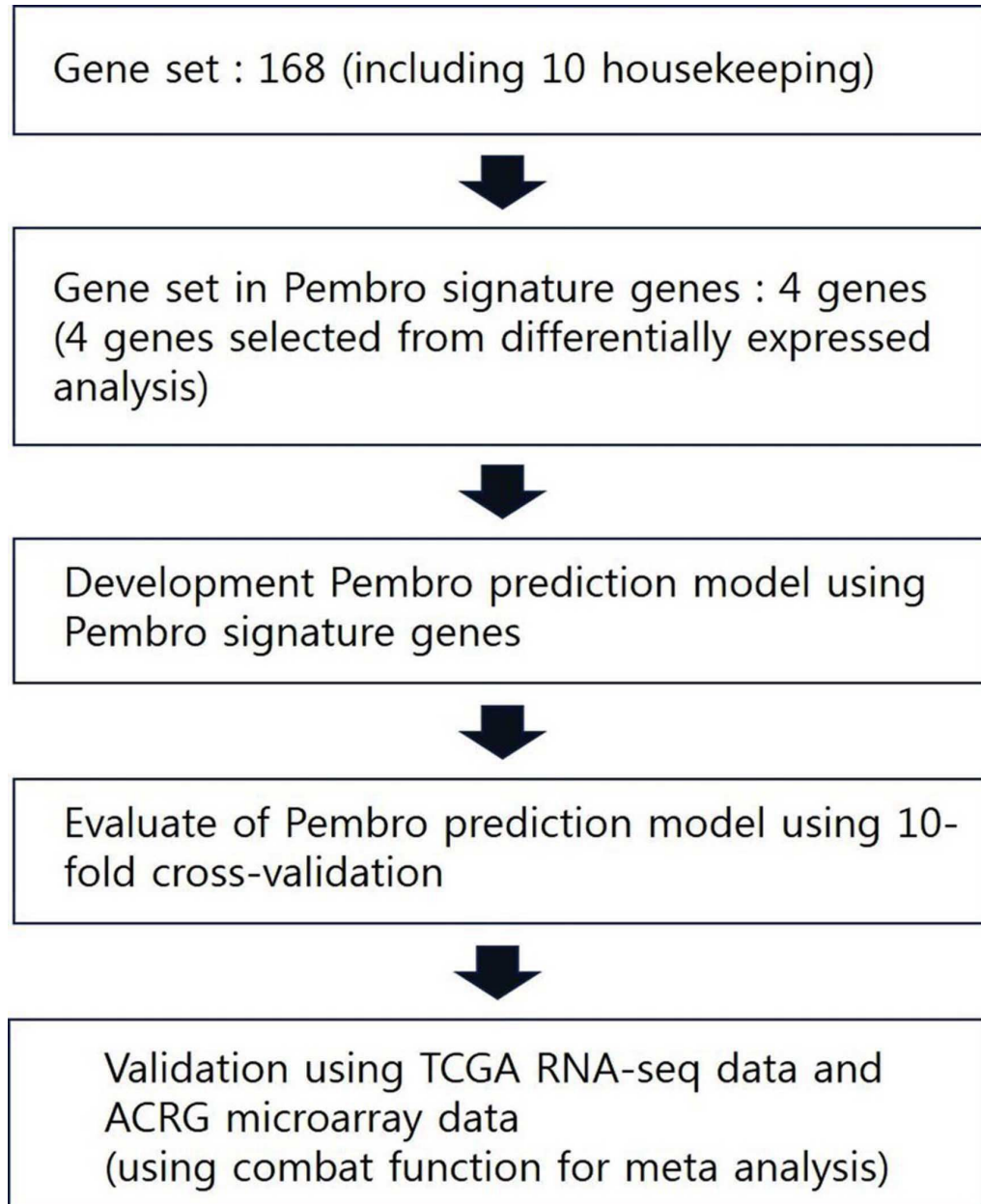
Sample	TMB (Tumor Mutation Burden)	MSI	EBV	PD-L1 CPS	IMAGiC score	IMAGiC group
1	9.27	MSS	Negative	0	0.9722	Non-responder
2	10.93	MSS	Negative	0	0.3100	Non-responder
3	3.37	MSS	Negative	0	1.3076	Non-responder
4	1.68	MSS	Negative	0	0.3926	Non-responder
5	4.2	MSS	Negative	0	0.3314	Non-responder
6	3.35	MSS	Negative	0	0.3534	Non-responder
7	0	MSS	Negative	0	0.3726	Non-responder
8	3.38	MSS	Negative	0	0.2417	Non-responder
9	6.75	MSS	Negative	0	0.2220	Non-responder
10	5.04	MSS	Negative	0	0.4416	Non-responder
11	2.54	MSS	Negative	0	1.6643	Non-responder
12	2.52	MSS	Negative	0	0.2412	Non-responder
13	5.05	MSS	Negative	0	1.0175	Non-responder
14	5.9	MSS	Negative	0	0.3310	Non-responder
15	2.53	MSS	Negative	0	0.7392	Non-responder
16	10.11	MSI-H	Negative	1	0.3268	Non-responder
17	8.43	MSS	Negative	0	0.8758	Non-responder

[0105]

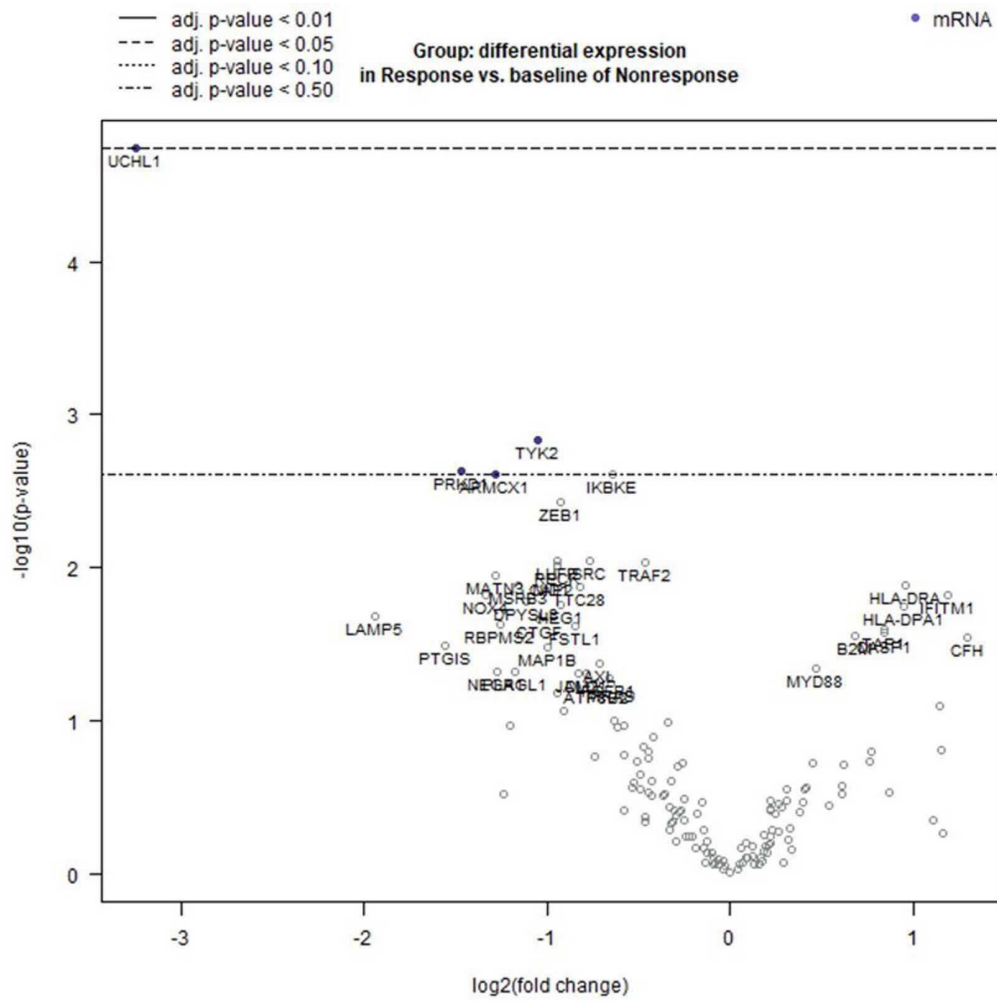
상기 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

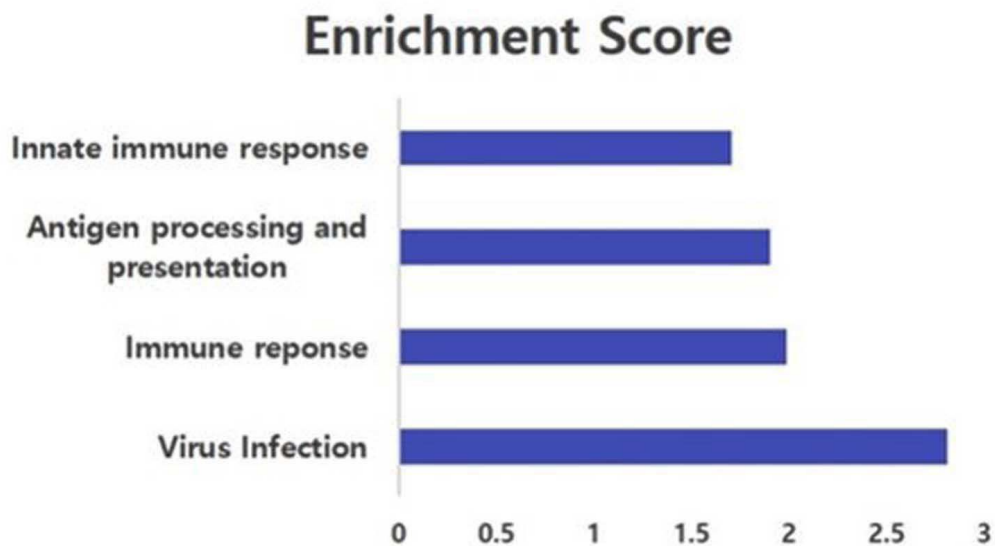
도면1



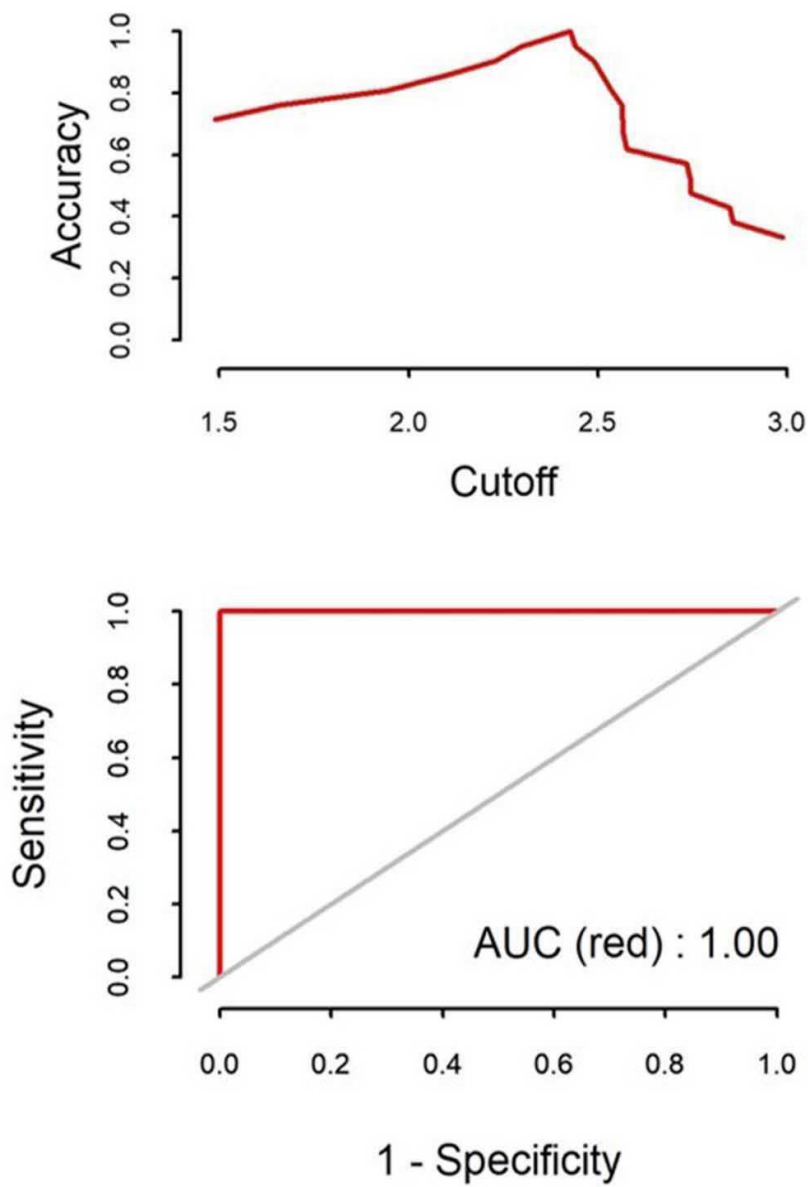
도면2a



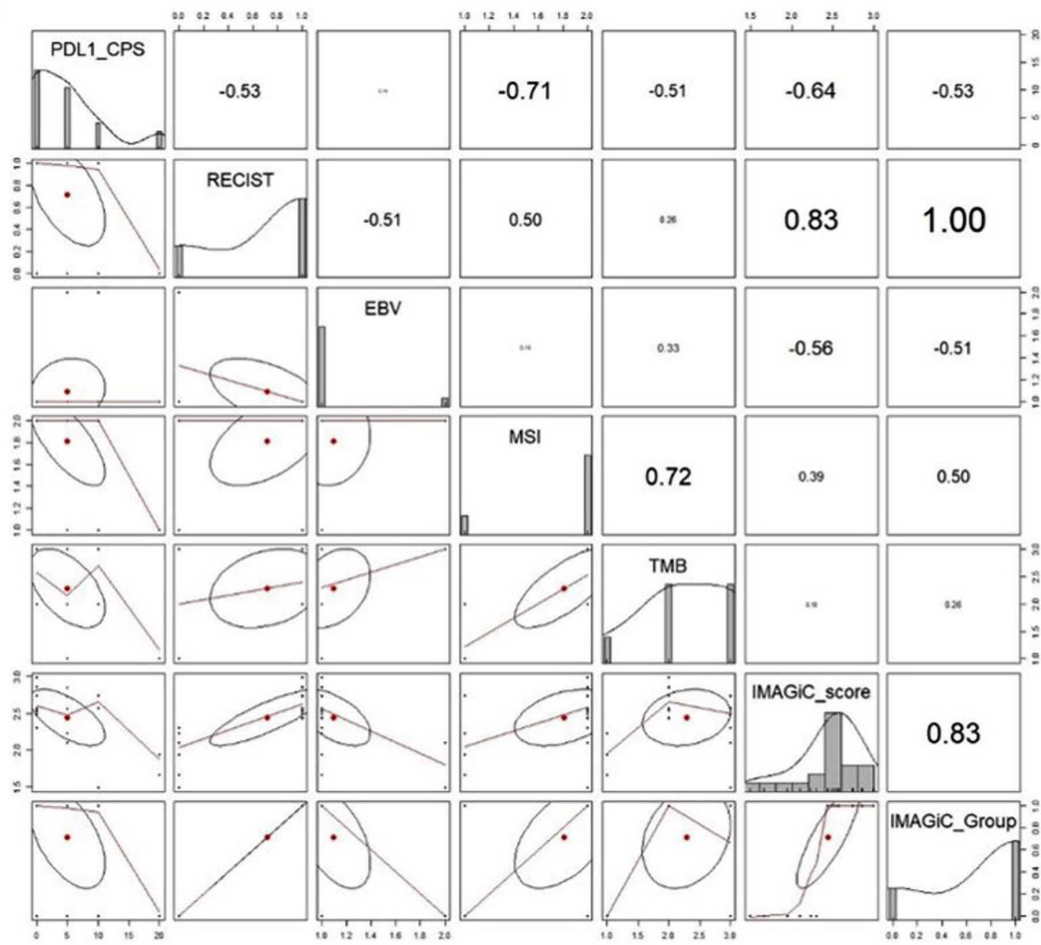
도면2b



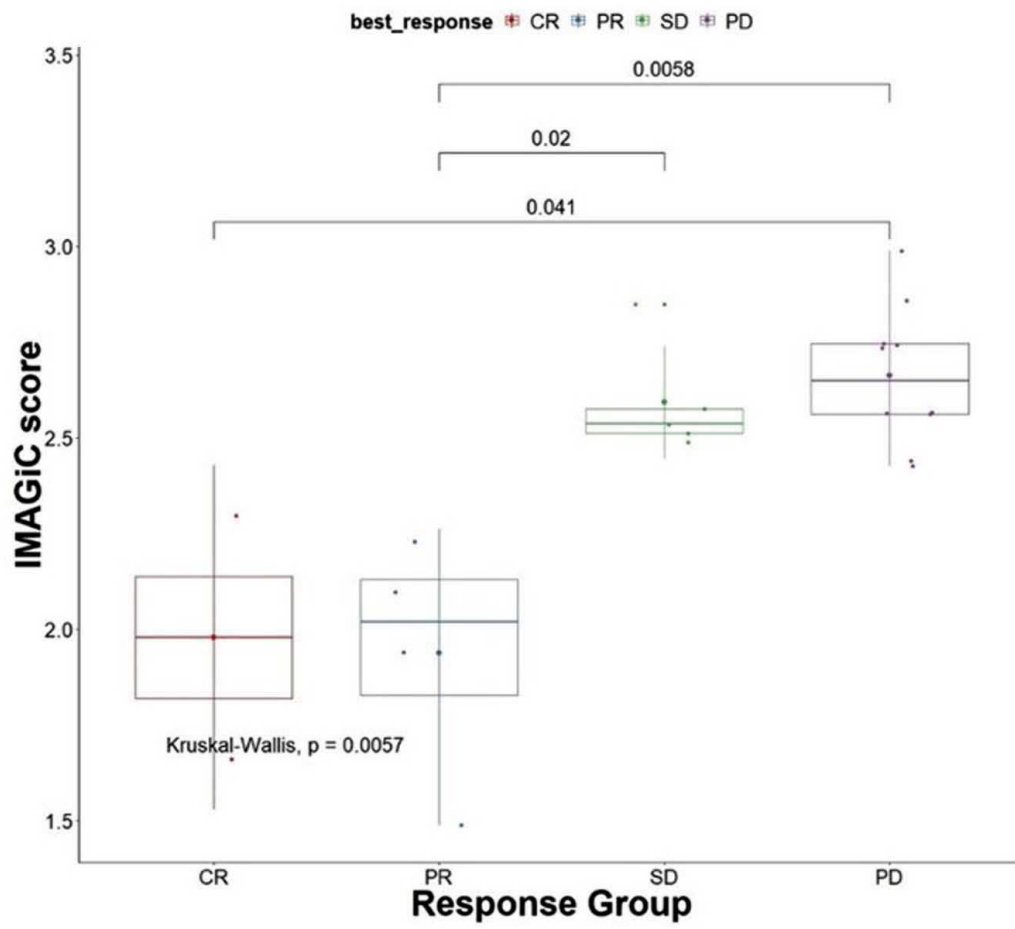
도면2c



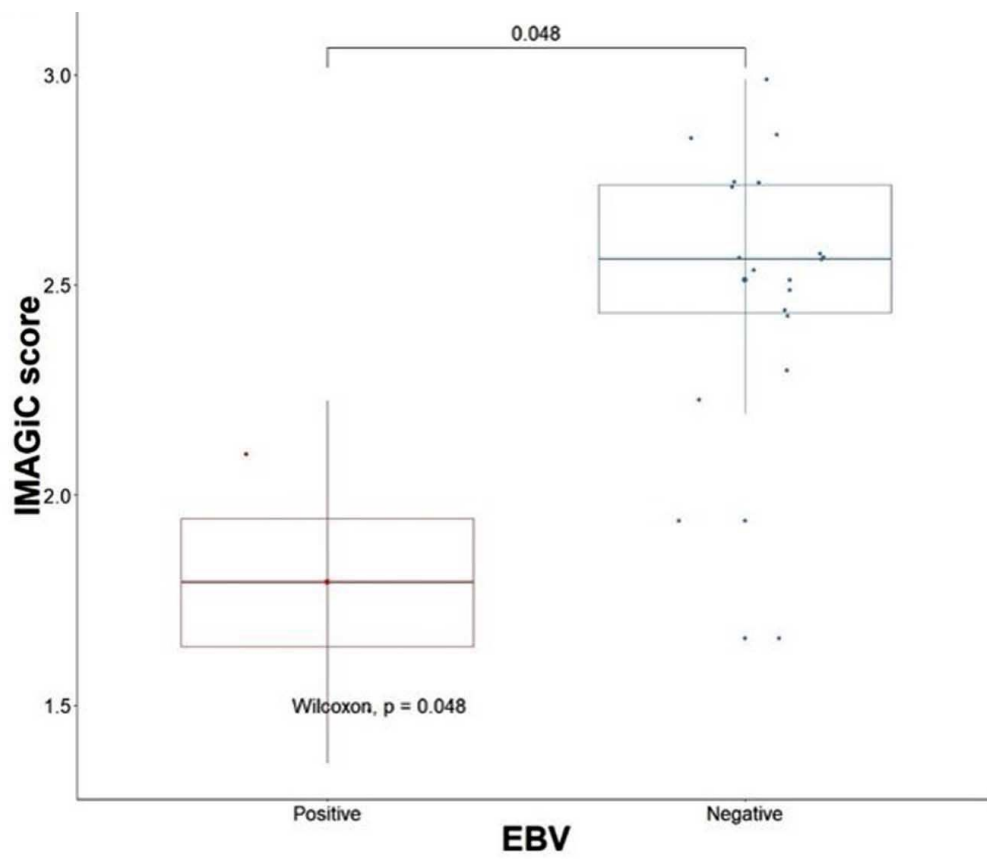
도면3a



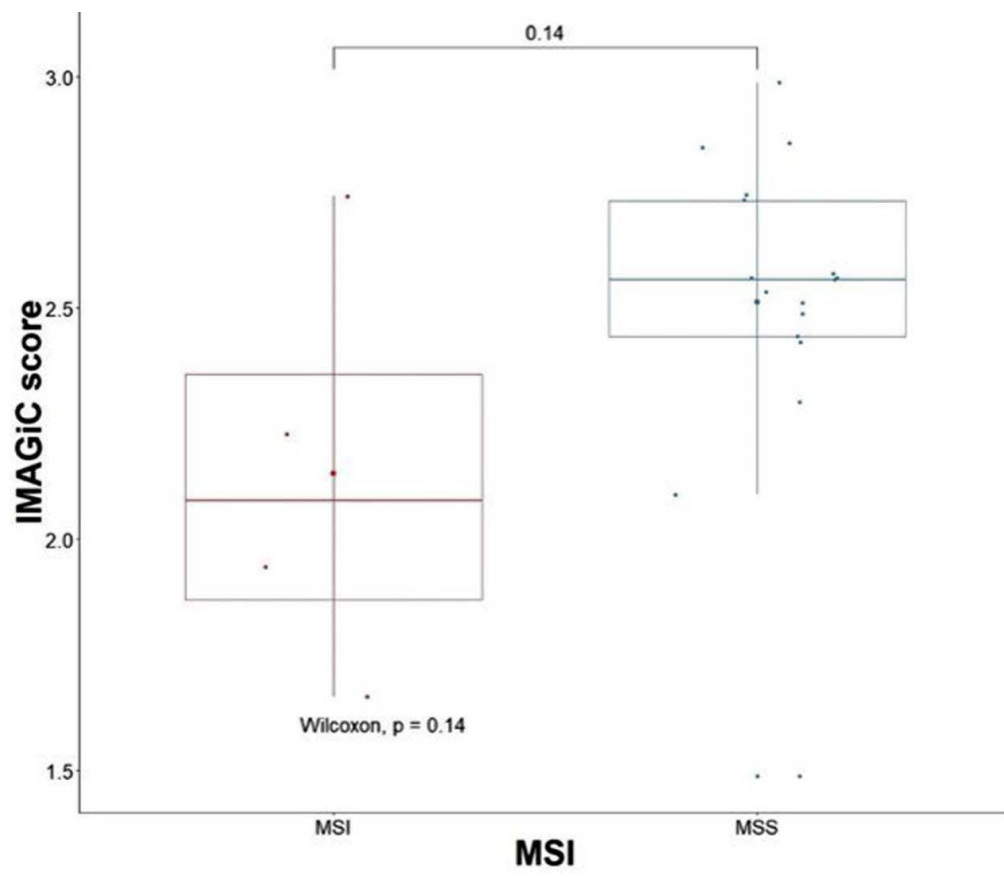
도면3b



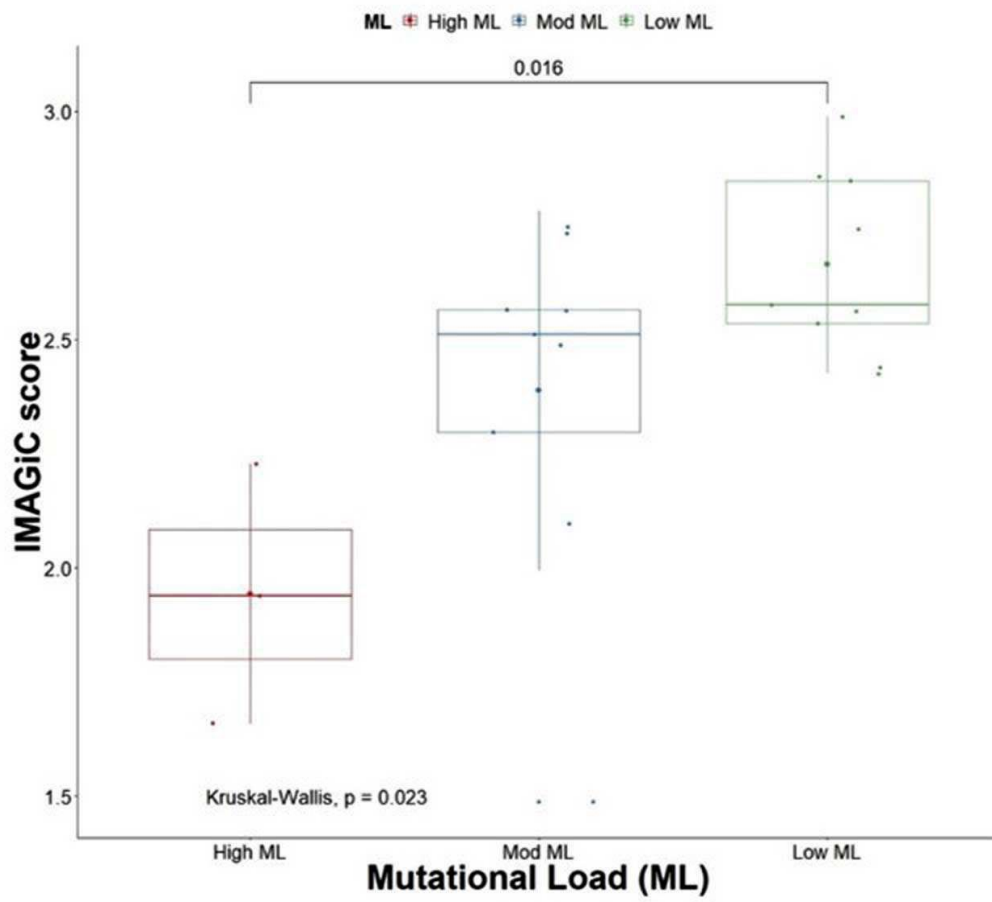
도면3c



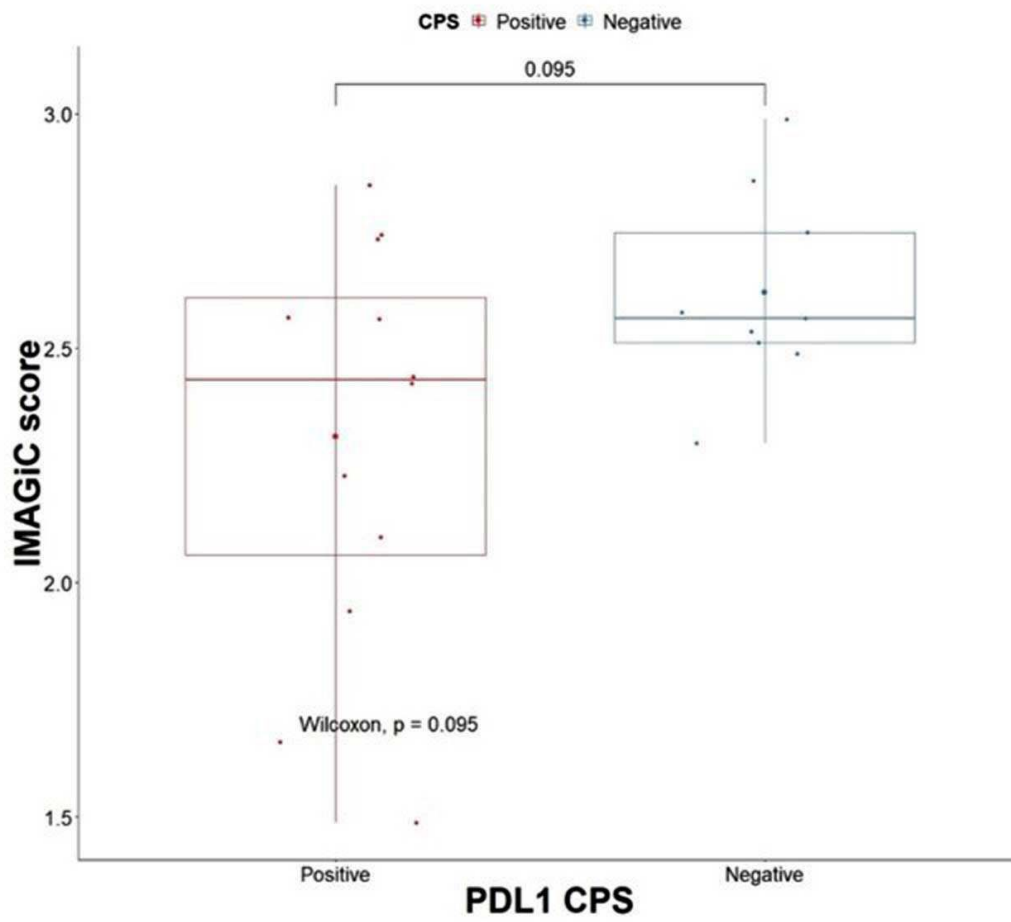
도면3d



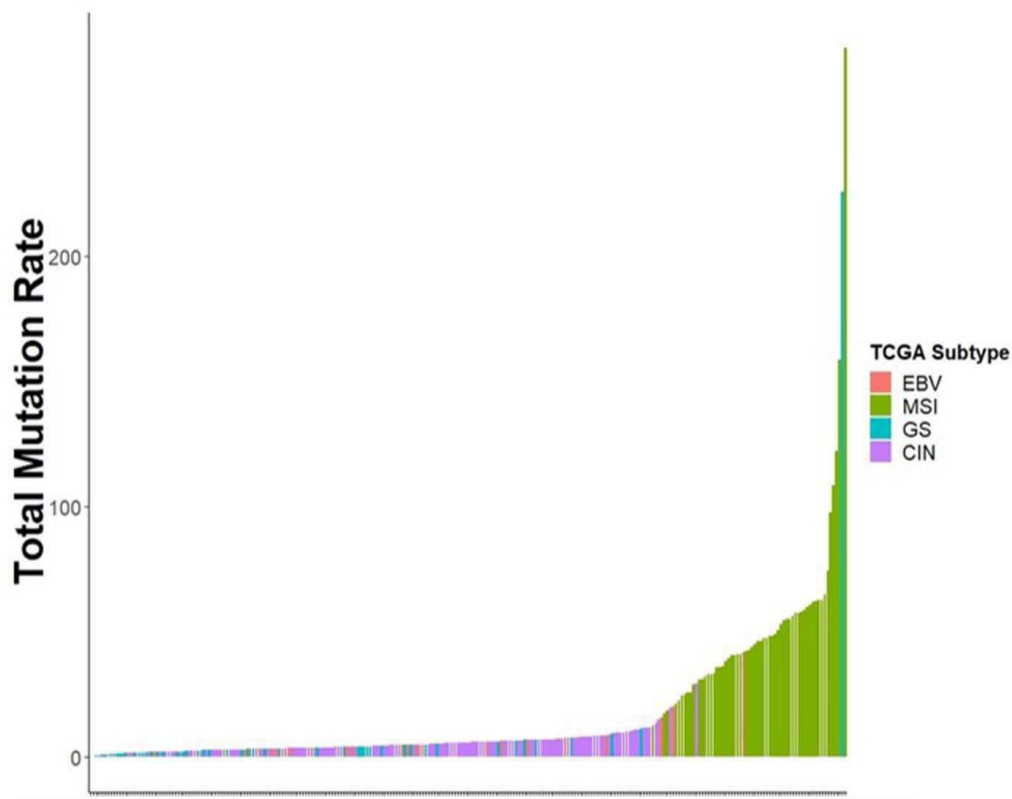
도면3e



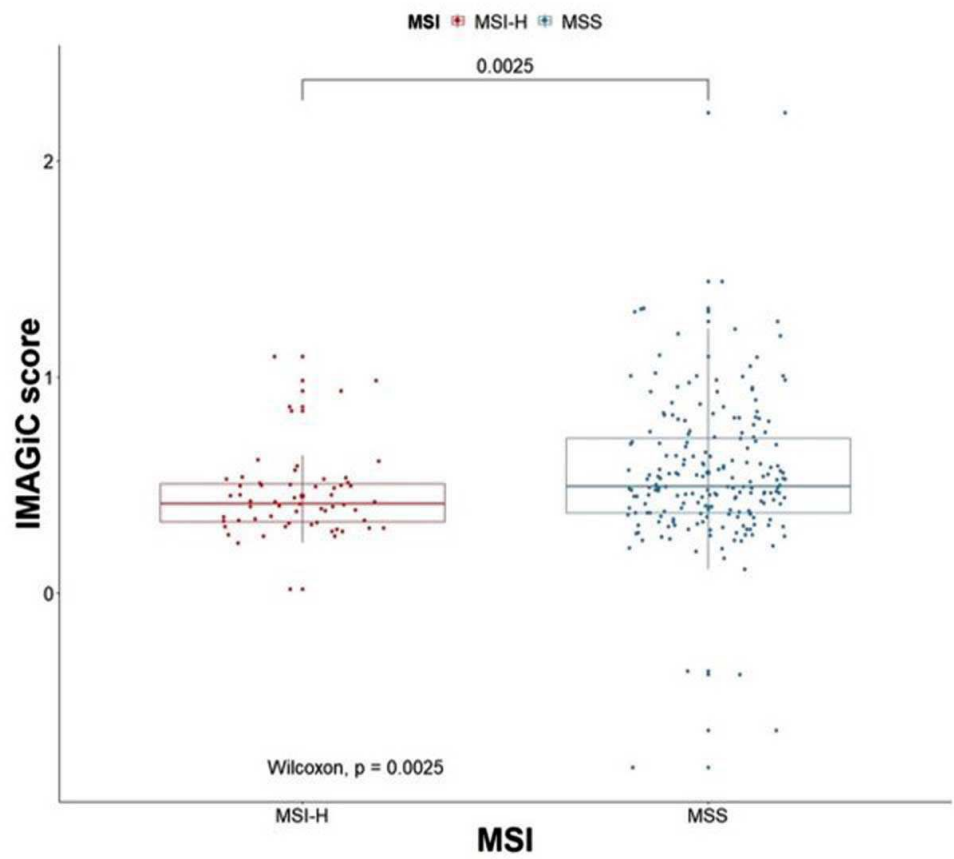
도면3f



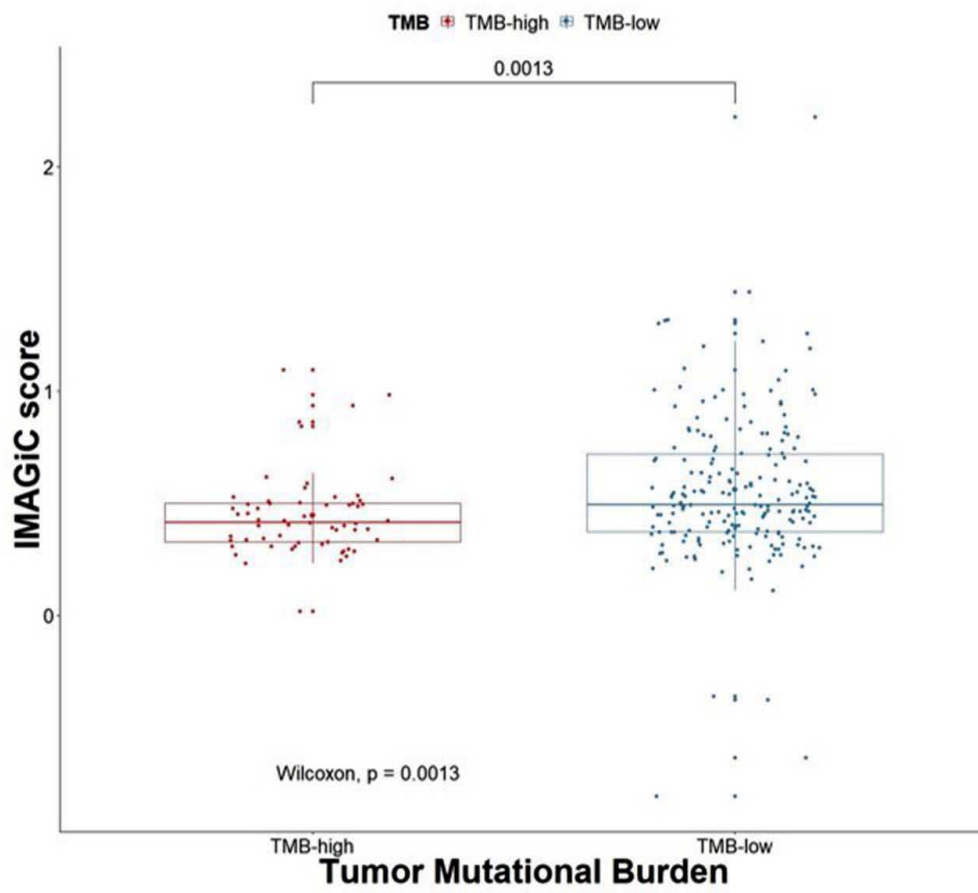
도면4a



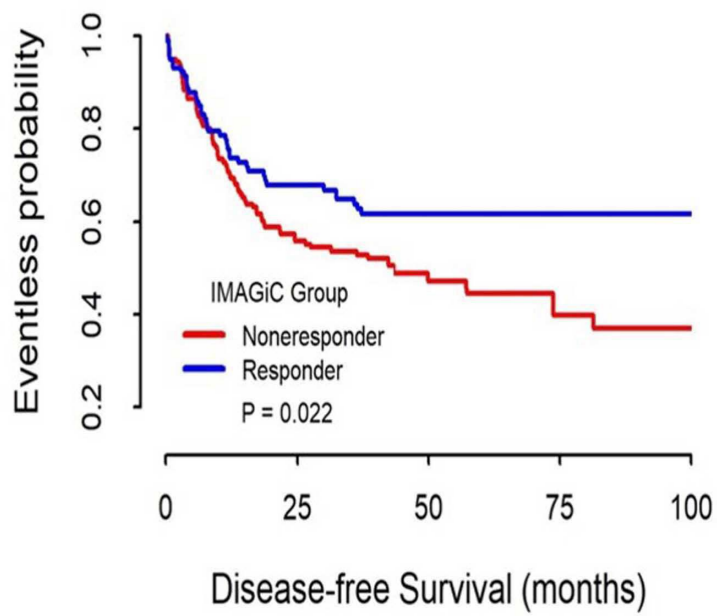
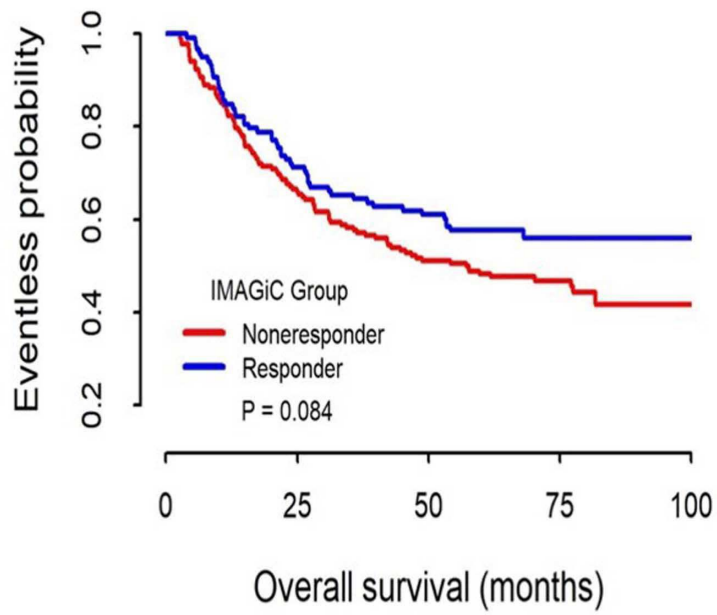
도면4b



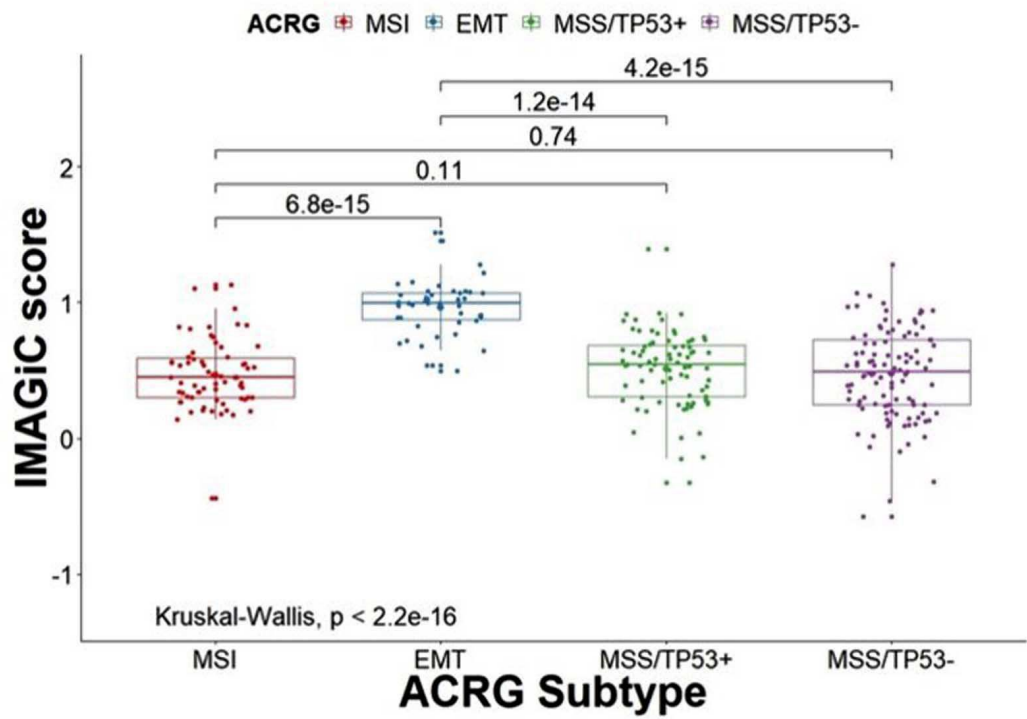
도면4c



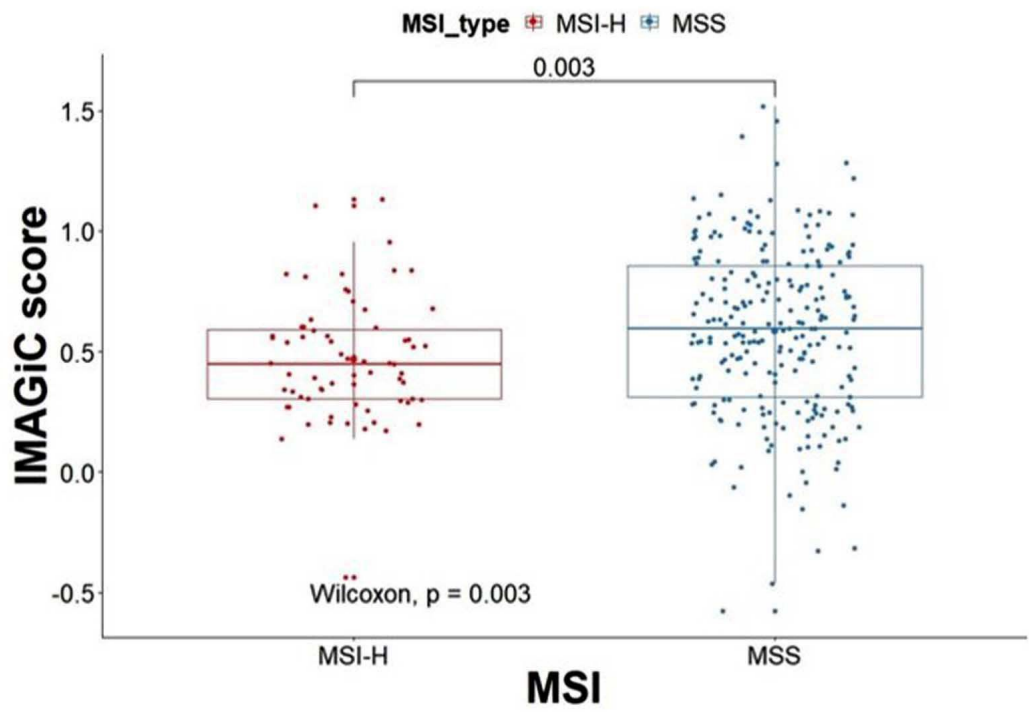
도면5a



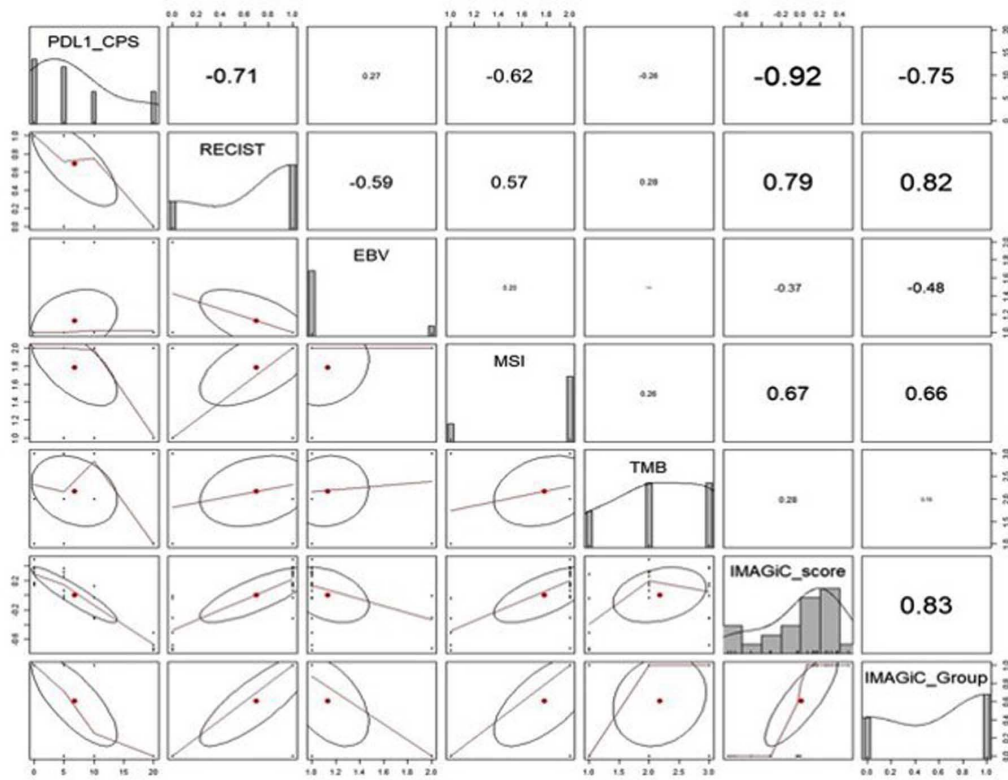
도면5b



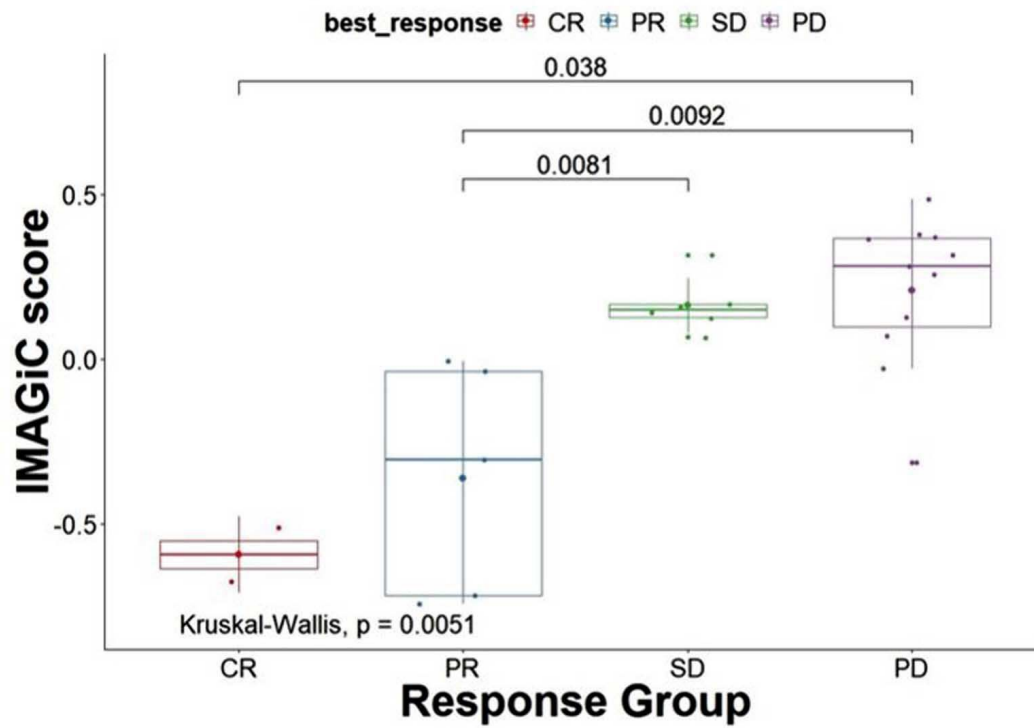
도면5c



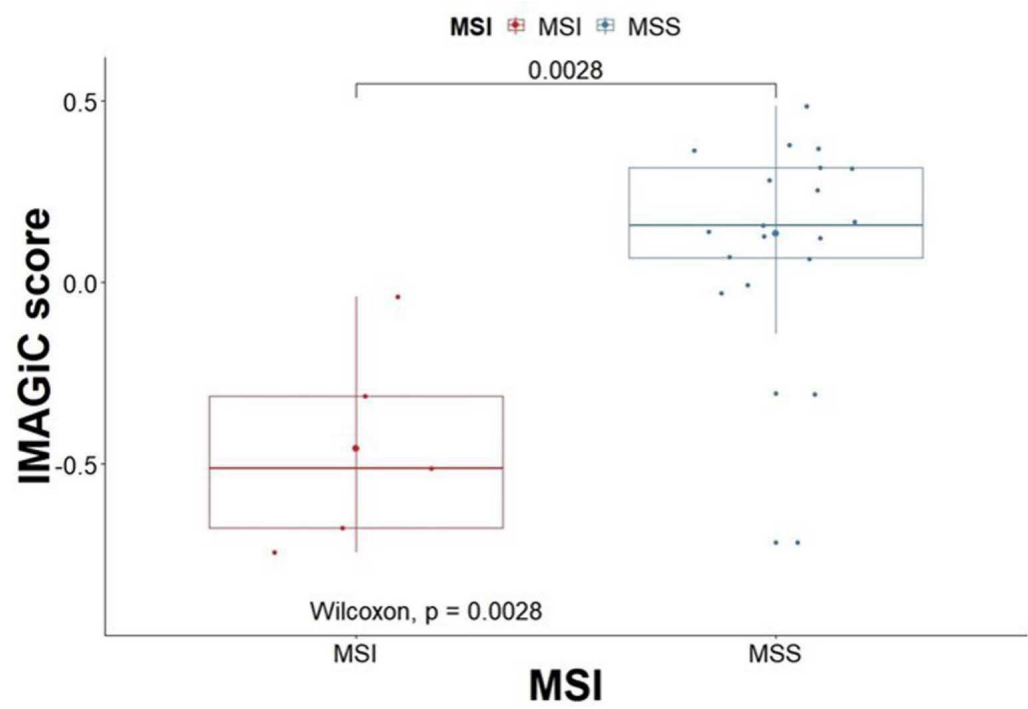
도면6a



도면6b



도면6c



도면6d

